

A3

PEPTIDE HAVING FUNCTION TO SUPPRESS TRANSCRIPTION OF GENE

Patent number: JP2001269178
Publication date: 2001-10-02
Inventor: TAKAGI MASARU; SHINSHI HIDEAKI; OTA MASARU
Applicant: NATL INST OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE & TECHNOLOGY METI
Classification:
- **international:** C12N15/09; C07K14/415; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10
- **europaean:**
Application number: JP20000087556 20000327
Priority number(s):

Abstract of JP2001269178

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a peptide derived from a higher plant having a function to bond to a DNA and suppress the transcription of gene, a gene coding for the peptide, a recombinant vector containing the gene and a transformant containing the recombinant vector.

SOLUTION: This invention relates to a peptide composed of the amino acid sequence (a) expressed by the sequence No.1 (refer to the specification) and a peptide composed of the amino acid sequence (a) wherein one or plural amino acids are deleted, substituted or added provided that the peptide has a function to suppress the transcription of the gene.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-269178
(P2001-269178A)

(43) 公開日 平成13年10月2日 (2001.10.2)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 K 14/415	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/415		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5
1/19		1/21	4 H 0 4 5
1/21		C 1 2 P 21/02	C
審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 13 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-87556(P2000-87556)

(22) 出願日 平成12年3月27日 (2000.3.27)

(71) 出願人 301000011

経済産業省産業技術総合研究所長
東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(72) 発明者 高木 優

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 進士 秀明

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 太田 賢

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド

(57) 【要約】

【課題】 DNAに結合し遺伝子の転写を抑制する機能を有する高等植物由来のペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体を提供する。

【解決手段】 (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、又は (b) アミノ酸配列 (a) において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、又は(b)アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド。

【請求項2】 (a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、又は(b)アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド。

【請求項3】 請求項1又は2に記載のペプチドをコードする遺伝子。

【請求項4】 請求項3に記載の遺伝子を含有する組み換えベクター。

【請求項5】 請求項4に記載の組み換えベクターを含む形質転換体。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体に関する。

【0002】

【従来の技術】植物ホルモン、エチレンに応答するシス制御エレメントに結合するタンパク質因子ERF (Ethylene Responsive Element binding Factor) は、ERFドメインと名付けたDNA結合ドメインを有する植物特有の転写因子である。最近の研究から、ERFタンパク質をコードする遺伝子は、マルチジーンファミリーを構成していることが明らかになっている。これまでに、タバコ、シロイヌナズナ植物からERFドメインを有するタンパク質因子をコードするcDNAが明らかにされているが、本発明者らはさらに、タバコ、イネ、シロイヌナズナのcDNAについて機能解析を行い、植物細胞内でリプレッサーとして機能するドメインを明らかにし、本発明を完成した。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】すなわち、本発明はDNAに結合し遺伝子の転写を抑制する機能を有する高等植物由来のペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、タバコ、イネ、シロイヌナズナのcDNAについて機能解析を行った結果、ERF因子のカルボキシ末端領域のアスパラギン酸-ロイシン-アスパラギン(DLN)からなるモチーフを有する領域が、遺伝子の転写を抑制する機能を有することを発見し、本発明を完成した。このようなD

LNモチーフを有し遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチドとしては、例えばタバコ由来のERF3に含まれるペプチド；シロイヌナズナ由来のAtERF3、AtERF4 (配列番号1)、AtERF7及びAtERF8に含まれるペプチド；イネ由来のOsERF3に含まれるペプチドが挙げられる。

【0005】

【発明の実施の形態】機能解析の方法は、それぞれのERF因子をコードしているcDNAから、タンパク質コード領域を切り出し、これを酵母のGAL4転写因子のDNA結合ドメインをコードしている領域と結合し、さらに植物細胞で機能するカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流につないでエフェクタープラスミドを構築する。これをGAL4タンパク質結合部位をプロモーター領域に結合した、ルシフェラーゼ遺伝子からなるリポーター遺伝子と同時に、タバコ培養細胞あるいはシロイヌナズナ葉にエレクトロポーション法により導入し、リポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子の活性を測定することによって調べた。

【0006】つぎに、リプレッサー因子に存在するリプレッサー機能を有する領域であるリプレッサードメインを同定するために、各遺伝子のコード領域を削除する方法であるディリーション解析法を用いて、ERF因子のどの領域にリプレッサードメインが存在するのかを調べた。

【0007】

【実施例】アラビドプシス (和名シロイヌナズナ) AtERF4遺伝子の単離

(プローブの作成)すでに塩基配列が決定されているタバコのERF3遺伝子のcDNAをクローニングしたプラスミドpERF3を制限酵素EcoRIとNotIで消化し、アガロースゲル電気泳動でERF3のcDNAを含む950bpのDNA断片を単離した。このDNA断片約50ngを100℃で10分変性した後、DNAラベリングキット (アマシヤムファルマシア社製Ready-To-Go DNA Labelling Beads)と5μLのアルファ32P-dCTP (アマシヤムファルマシア社AA0005)をもちいて標識し、プローブを作成した。

【0008】(cDNAの作成とスクリーニング)アラビドプシス植物体から葉を採取し、液体窒素中でミキサーを用いて粉状に粉碎する。この粉碎した葉粉末10gに対し20mLのRNA抽出バッファー (8M塩酸グアニジン、20mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、20mM 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、50mM メルカプトエタノール)と8mLのTE溶液 (10mM Tris-Cl pH8.0, 1mM EDTA)で飽和したフェノールと2mLのクロロホルムを加えよく攪拌し、遠心 (10000g)して上精を回収する。上精に対して0.2倍容量の1M酢酸と0.7倍容量のエタノールを加え-20℃で静置した後、遠心 (10000g)する。沈殿を2mLのTE溶液に溶解し、500mLの10M塩化リチウム溶液を加え、0℃

で2時間静置し、遠心する。沈殿を70%のアルコールで洗浄した後、風乾し、全RNA標品を得た。この全RNAをプロメガ社製Poly A Tract System 1000 を用いて全RNAからmRNAのみを精製した。このmRNAを鋳型としてファルマシア社製cDNAダイレクションクローニングキットを用いて二本鎖cDNAを合成。これらをファルマシア社のプロトコールに従ってラムダgt11発現ベクターのEcoRI-NotI制限酵素サイトに組み込んだのち、ラムダパッケージングキット（ファルマシア社）を用いてライブラリーを完成させた。

【0009】作成したアラビドプシスcDNAライブラリーを組み込んだラムダファージがプレート（10cm x 14cm）一枚につき約4万個のプラークが得られる容量を、予め0.5ccmLの10mMの硫酸マグネシウム溶液で懸濁しておいた大腸菌1090株に懸濁して感染させ、選択するための薬剤である50mg/Lのアンプシリン酸ナトリウムLB寒天培地（1Lに対して10gトリプトン、10g塩化ナトリウム、5gイーストイクトラクト、15g寒天）に展開し、37°Cで培養する。プラークが約2mmになった時点でニトロセルロース膜（S&S社製）に写し取り、変性液（0.2M NaOH, 1.5M NaCl）に浸した濾紙（ワットマン3MM）上に5分、中和液（0.4M Tris-HCl, pH7.5, 2xSSC）に浸した濾紙上で5分間静置した後、2xSSC溶液に5分間浸し、濾紙上で20分間風乾する。80°Cで120分乾燥させ、プラークDNAをニトロセルロース膜に固定する。

【0010】ニトロセルロース膜（10cm x 14cm）1枚につき2mLのハイブリダイゼーションバッファー（6x SSC, 0.05% skim milk）に浸し60°Cで2時間保温した後、100°C10分間加温し、急冷によって変性させたERF3のプロープを含む新しいバッファーと交換し、60°Cで12時間保温した。その後、フィルター1枚につき5mLの0.1%のSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）を含む2xSSC溶液で15分、0.1%のSDSを含む0.5xSSCで15分、0.1%のSDSを含む0.2xSSCで15分洗浄し、X線フィルムに感光させた。ERF3のプロープが結合したプラークを寒天プレートから単離し、1mLのファージバッファー（10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgSO4）に懸濁し、ファージを回収した後、上記のスクリーニングを3回繰り返し、単一プラークを得た。このプラークを再び大腸菌に感染させ増幅して、ファージよりDNAを抽出し、cDNA領域を制限酵素EcoRIとNotIを用いて切り出した。このDNA断片をプラスミドpT7D3（ファルマシア社）の制限酵素EcoRI-NotI部位に組み込み、プラスミド塩基配列の解析をおこなった。配列番号1に示すAtERF4のcDNAの全長配列を持つプラスミドをpAtERF4と名付けた。

【0011】AtERF4リプレッションドメインの同定エフェクタープラスミドの構築

（AtERF4全長を含むエフェクタープラスミドpGAL4DB-AtERF4の構築：図1）クローンテック社製（Clontech社、USA）のプラスミドpBI221を制限酵素XhoIとSstIで切断

し、T4ポリメラーゼで平滑末端処理した後、アガロースゲル電気泳動でGUS遺伝子を除き、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター（以下CaMV35S）とノパリン合成酵素遺伝子の転写終止領域（Nosターミネーター、以下Nos-ter）を含む35S-Nosプラスミド断片DNAを得た。クローンテック社製のpAS2-1ベクターを制限酵素HindIIIで消化し、酵母 GAL4タンパク質のDNA 結合領域（1-147 アミノ酸残基）をコードする748 bpのDNA断片（以下GAL4DBD）をアガロースゲル電気泳動によって単離した後、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理をした。このGAL4DBDを含むDNA断片を、先ほどの35S-NosのDNAの35SプロモーターとNosターミネーター間の平滑末端にした部位に挿入し、35Sプロモーターに対して酵母 GAL4タンパク質のDNA 結合領域の ORF が順方向に並んでいるものを選抜してp35S-GAL4DBDベクターを構築した。

【0012】AtERF4のcDNAプラスミドpAtERF4とGAL4DBDと読み枠（フレーム）が一致するように設計した5'末アッパープライマーprimer1（配列番号3：AtERF4塩基配列1-20に結合）GATGGCCAAGATGGGCTTGAAと制限酵素SalI部位を持つ3'末ローワープライマーprimer2（配列番号4：AtERF4塩基配列649-669に結合）GTCGACTCAGGCCTGTTCCGATGGAGGを用いてAtERF4全タンパク質コード領域（配列番号1：AtERF4塩基配列1-669；アミノ酸配列1-222）をPCR法によって増幅し、DNA断片を得た。PCR反応の条件は、変性反応94°C1分、アニール反応47°C2分、伸長反応74°C1分を1サイクルとして25サイクルおこなった。以下全てのPCR反応は同じ条件でおこなった。得たDNA断片を制限酵素SalIで消化した後、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このAtERF4をコードするDNA断片を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-AtERF4を構築した。このエフェクタープラスミドpGAL-AtERF4を構築する手順を図1に示した。

【0013】（AtERF4アミノ酸183/222を含むエフェクタープラスミドpGAL-166/225AtERF4の構築）pAtERF4プラスミドとGAL4DBDをコードするフレームと読み枠が一致するように設計した5'末アッパープライマーprimer3（配列番号5：結合部位AtERF4塩基配列549-559）GGCTTGCGTGGCCAAAGCGACTCと制限酵素SalI部位を持つ3'末ローワープライマーprimer2（配列番号4：結合部位AtERF4塩基配列591-678）GTCGACTCAGGCCTGTTCCGATGGAGGを用いてAtERF4のアミノ酸配列183/222コード領域に該当する塩基配列549-678の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素SalIで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このAtERF4のアミノ酸配列183/222にをコードするDNA断片（DNA領域549-678）を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-183/222AtERF4を構築した。

【0014】(レポーター遺伝子の構築: 図2及び図3) プラスミドpUC18を制限酵素EcoRIとSstIで消化する。pBI221(クローンテック社)を制限酵素EcoRIとSstIで消化し、Nos-ter(nopaline synthase terminator)を領域含む270bpのDNA断片を挿入するアガロースゲル電気泳動によって単離する。得られた断片を制限酵素EcoRIとSstIで消化しておいたプラスミドpUC18のEcoRI-SstI部位に挿入する。カリフラワーモザイクウイルス35SプロモーターTATAボックスを含む相補鎖のDNA 1

(配列番号6) AGCTTAGATCTGCAAGACCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTGGAGAGGACACGCTG及びDNA 2(配列番号7) GATCCAGCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAAGTTCCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCAGATCTAを合成する。合成したDNAを90℃2分加熱した後、60℃で1時間加熱し、その後室温(25℃)で2時間静置してアニーリングさせ2本鎖を形成させる。Nos-terを持つpUC18プラスミドを制限酵素HindIIIとBamHIで消化する。合成した2本鎖DNAをpUC18のHindIII-BamHI部位に挿入し、TATA-boxとNos-terを含むプラスミドを構築する。上記の手順は、図2に示した。

【0015】このプラスミドを制限酵素SstIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなう。ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子(LUC)をもつプラスミドベクターPGV-CS2(東洋インキ社製)を制限酵素XbaIとNcoIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなった後、アガロースゲル電気泳動によって、ルシフェラーゼ遺伝子を含む1.65 kbのDNA断片を単離精製した。このDNA断片を上記のTATAボックスとNosターミネーターを含むプラスミドに挿入しTATA-LUCリポーター遺伝子を構築した。酵母のGAL4タンパク質のDNA結合配列を5コピー持つプラスミドpG5CAT(Clontech社製)を制限酵素SmaIとXbaIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなった後、5コピーのGAL4タンパク質のDNA結合配列を含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動で精製した。TATA-LUCベクターを制限酵素BglIIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなう。この部位に平滑末端化した5コピーのGAL4タンパク質のDNA結合配列を含むDNA断片を挿入し、得られたプラスミドのうちGAL4タンパク質のDNA結合配列が順方向に向いているものを選抜し、リポーター遺伝子GAL4-LUCを構築した。(図3参照)

【0016】(レファレンス遺伝子の構築) ウミシイタケ由来のルシフェラーゼ遺伝子をもつプロメガ社製カセットベクターpRL-nullを制限酵素NheIとXbaI制限酵素で切断し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理を行った後、アガロースゲル電気泳動でウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子を含む948 bpのDNA断片を精製する。このDNA断片をエフェクタープラスミドの構築の際に用いたGUS遺伝子を除いたpBI221ベクターのGUS遺伝子があった領域に挿入する。得られたプラスミド

のうち、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子が順方向に向いているものを選抜する(pPTRLの構築)。

【0017】(レポーター遺伝子の活性測定法) タバコ培養細胞プロトプラストにリポーター遺伝子とエフェクタープラスミドをエレクトロポレーション法を用いて導入し、エフェクターの効果のリポーター遺伝子の活性を測定することによって調べた。

(プロトプラストの調製法) 100 mLのMS培地(ムラシゲ・スコーグ培地用混合塩類、日本製薬社製、3%シヨ糖、0.2 g/L KH₂PO₄、0.2 g/L m-inositol、2 mg/L glycine、1 mg/L 塩酸チアミン、0.2 mg/L 2, 4-D、pHを5.8に調節する)に7日間培養したタバコ培養細胞BY-2の前培養液3 mLを加えて26℃で3日間暗所で培養した細胞を金属製のメッシュ(目の開きが125 µm、東京スクリーン社製)濾過回収し、0.4 M マニトールを含むMS培地で細胞を洗浄する。洗浄した細胞を25 mLの0.4 M マニトールを含むMS培地に懸濁して10分間室温で放置3,000 rpmで1分間遠心して細胞を回収する。この細胞を20 mLの1%セルラーゼ(オノヅカRS、)と0.1%ペクトリアーゼY-23(セイシン社製)を含むMS培地に細胞を再懸濁して、26℃で90分間暗所で60 rpmで回転振とうしながら細胞壁を消化する。その後、1,000 rpmで5分間遠心してプロトプラストを回収する。

【0018】(エレクトロポレーションによる遺伝子導入) 上記で得たプロトプラストを濃度が2.5 × 10⁶ 細胞/mLになるようにエレクトロポレーション緩衝液(5 mM MES pH5.8、70 mM KCl、0.3 M マニトール)に再懸濁する。エレクトロポレーション用キューベット(ジーンパルサーキューベット 0.4 cm electrode、バイオラッド社製)に構築したpGAL4-LUCレポーター遺伝子とエフェクタープラスミドとしてpGALDB-AtERF4あるいはそのデレーションシリーズ(pGALDB-1/25AtERF4~pGALDB-204-225AtERF4)のDNAを各10 µgとリファレンス遺伝子プラスミド1 µgを100 µLの2Xエレクトロポレーション緩衝液(10 mM MES pH5.8、140 mM KCl、0.6 M マニトール)を加えて、滅菌水で全量を200 µLにする。キューベットに600 µLのプロトプラスト懸濁液を入れて、エレクトロポレーター(Genepulser II Electroporation System、バイオラッド社製)を用いて600 V、25 µFの条件でDNAを導入する。導入後、キューベットからプロトプラストを1,000 rpmで5分間遠心して回収し、5 mLの0.4 M マニトールを含むMS培地にプロトプラストを再懸濁して、26℃で6時間暗所で静置した後、レポーター遺伝子の活性を測定した。

【0019】(ルシフェラーゼ活性測定) 6時間静置したプロトプラスト懸濁液を1 mL採取して、2,000 rpmで3分間遠心してプロトプラストを回収した後、Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega社製)に添付されているPassive Lysis Buffer 50 µLに懸

濁する。プロトプラストを破砕した後、遠心して上清を回収する。この細胞抽出液を5 μ L 用いて Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System (Promega 社製) とルミネッセンスリーダー (BLR-201, アロカ社製) を用いてルシフェラーゼ活性測定を行なった。ホタル・ルシフェラーゼおよびウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性の測定を測定キットの説明書に従って 10 秒間の発光を積分モードでカウントした。リファレンス遺伝子の活性値をリポーター遺伝子の活性値で割り、その相対値である Relative luciferase activity を測定値として求めた。エフェクターを入れない場合の相対値を100として、エフェクタープラスミドを同時に細胞に導入したときにリポーター遺伝子の活性値の変動によってエフェクターの効果を調査した。すなわち、pGAL4-LUCリポーター遺伝子とpGALDB-AtERF4エフェクタープラスミドを導入したときのリポーターの活性値がとら減少することから、pGALDB-AtERF4は、レポーター遺伝子の活性を抑制する効果 (リプレッサー機能) があることを示している。以下、リポーターの活性値を測定して、リポーターの相対活性値が100以下になる場合に、導入したエフェクターにはリプレッサー機能が存在するので、どのエフェクターがリプレッサーとして機能するのかをレポーターの活性を測定することによって調べた。

【0020】 (リプレッサードメインの同定) アラビドプシスAtERF4の遺伝子の転写制御に関わる機能を解析するため、リポーター遺伝子pGAL4-LUCとpGALDB-AtERF4をタバコ培養細胞より調整したプロトプラストにエレクトロポレーション法によって導入し、リポーター遺伝子の活性を調べた。その結果、pGAL-AtERF4エフェクターは、リポーター遺伝子の活性をエフェクターを導入しないリポーター遺伝子のみの場合 (コントロール) に比べ75%に減少させた。対照実験としておこなったAtERF4のコード領域を含まないp35S-GALDBDは、リポーター遺伝子の活性に影響を及ぼさなかった。このことは、AtER

SEQUENCE LISTING

<:110>:Secretary of Agency of Industrial Science and Technology

<:120>:Novel repression domain of plant specific transcription factor

<:130>:

<:160>: 7

<:210>: 1

<:211>: 795

<:212>: DNA

<:213>:Arabidopsis thaliana

<:400>:1

F4が転写を抑制するリプレッサーとして機能していることを示している。

【0021】 次に、AtERF4遺伝子のタンパク質コード領域をディリーションしたDAN断片もつエフェクタープラスミド、pGAL-183/222AtERF4が、リポーター遺伝子の活性を抑制する機能をもつかを調べた。pGAL-183/222AtERF4エフェクタープラスミドをリポーター遺伝子と共にタバコ培養細胞に導入し、リポーター遺伝子の活性を測定した結果、pGAL-183/222AtERF4エフェクターは、pGALDB-AtERF4を導入した場合と同様に、レポーター遺伝子の活性をコントロールに比べ、約50%に抑えるリプレッサー機能があることが示された。(図4B)。この結果から、AtERF4のリプレッサー機能を持つ領域 (リプレッションドメイン) は、AtERF4のアミノ酸配列、183/222に存在することを明らかにした (図4B)。このアミノ酸配列を配列番号2に示した。

【0022】 本発明の遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチドは、例えばガン遺伝子の転写調節領域に特異的に結合するDNA結合タンパク質と融合させて、細胞内で発現させることにより、ガン遺伝子の発現を効率的に抑制することが可能となる。また、リプレッサー機能は調べたところ遺伝子に非特異的であるが、DNAとの結合が必要であることから、特定のDNAに結合するDNA結合ドメインと融合することにより、遺伝子特異的あるいは非特異的に転写を抑制することが可能となる。このことによって、例えば色素代謝系の酵素をコードする遺伝子の発現を制御することが可能となり、これまでには得られなかった色違いの花弁を有する花を創作することができる。また、アレルゲンとなるタンパク質の発現を抑制することによって、アレルゲンの少ない食物の生産も可能となる。

【0023】

【配列表】

atg gcc aag atg ggc ttg aaa ccc gac ccg gct act act aac cag acc	48
Met Ala Lys Met Gly Leu Lys Pro Asp Pro Ala Thr Thr Asn Gln Thr	
5 10 15	
cac aat aat gcc aag gag att cgt tac aga ggc gtt agg aag cgt cct	96
His Asn Asn Ala Lys Glu Ile Arg Tyr Ser Gly Val Ser Lys Arg Pro	
20 25 30	
tgg ggc cgt tat gcc gcc gag atc cga gat ccg ggc aag aaa acc cgc	144
Trp Gly Arg Tyr Ala Ala Glu Ile Arg Asp Pro Gly Lys Lys Thr Arg	
35 40 45	
gtc tgg ctt ggc act ttc gat acg gct gaa gag gcg gcg cgt gct tac	192
Val Trp Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Glu Glu Ala Ala Arg Ala Tyr	
50 55 60	
gat acg gcg gcg cgt gat ttt cgt ggt gct aag gct aag acc aat ttc	240
Asp Thr Ala Ala Arg Asp Phe Arg Gly Ala Lys Ala Lys Thr Asn Phe	
65 70 75 80	
cca act ttt ctc gag ctg agt gac cag aag gtc cct acc ggt ttc gcg	288
Pro Thr Phe Leu Glu Leu Ser Asp Gln Lys Val Pro Thr Gly Phe Ala	
85 90 95	
cgt agc cct agc cag agc agc acg ctc gac tgt gct tct cct ccg acg	336
Arg Ser Pro Ser Gln Ser Ser Thr Leu Asp Cys Ala Ser Pro Pro Thr	
100 105 110	
tta gtt gtg cct tca gcg acg gct ggg aat gtt ccc ccg cag ctc gag	384
Leu Val Val Pro Ser Ala Thr Ala Gly Asn Val Pro Pro Gln Leu Glu	
115 120 125	
ctt agt ctc ggc gga gga ggc ggc ggc tcg tgt tat cag atc ccg atg	432
Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Cys Tyr Gln Ile Pro Met	
130 135 140	
tcg cgt cct gtc tac ttt ttg gac ctg atg ggg atc ggt aac gta ggt	480
Ser Arg Pro Val Tyr Phe Leu Asp Leu Met Gly Ile Gly Asn Val Gly	
145 150 155 160	
cgt ggt cag cct cct cct gtg aca tcg gcg ttt aga tcg ccg gtg gtg	528

Arg Gly Gln Pro Pro Pro Val Thr Ser Ala Phe Ser Ser Pro Val Val
 165 170 175

cat gtt gcg acg aag atg gct tgt ggt gcc caa agc gac tct gat tcg 576

His Val Ala Thr Lys Met Ala Cys Gly Ala Gln Ser Asp Ser Asp Ser
 180 185 190

tca tcg gtc gtt gat ttc gaa ggt ggg atg gag aag aga tct cag ctg 624

Ser Ser Val Val Asp Phe Glu Gly Gly Met Glu Lys Ser Ser Gln Leu
 195 200 205

tta gat cta gat ctt aat ttg cct cct cca tcg gaa cag gcc tga gct 672
 Leu Asp Leu Asp Leu Asn Leu Pro Pro Pro Ser Glu Gln Ala Trp Ala
 210 215 220

ttt aac ggt gtc gtt tca att cga agc gca tgc gtt tct tct tct ttt 720

Phe Asn Gly Val Val Ser Ile Arg Ser Ala Cys Val Ser Ser Ser Phe
 225 230 235 240

tga gct gtg aaa att cgt ttt ctc ata gtt ttt cct ctc tct ctc tct 768
 Trp Ala Val Lys Ile Arg Phe Leu Met Val Phe Pro Leu Ser Leu Ser
 245 250 255

cag tct aaa ttt att acc agt ttt tag 795
 Gln Ser Lys Phe Ile Thr Ser Phe
 260

<:210>: 2
 <:211>: 40
 <:212>: RPT
 <:213>: Arabidopsis thaliana

<:400>: 2
 Ala Cys Gly Ala Gln Ser Asp Ser Asp Ser Ser Ser Val Val Asp Phe
 5 10 15
 Glu Gly Gly Met Glu Lys Ser Ser Gln Leu Leu Asp Leu Asp Leu Asn
 20 25 30
 Leu Pro Pro Pro Ser Glu Gln Ala
 35 40

<:210>: 3
 <:211>: 21
 <:212>: DNA
 <:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA
 <:400>: 3

gatggccaag atgggcttga a

<:210>: 4
 <:211>: 27
 <:212>: DNA
 <:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 4
 gtcgactcag gcctgttccg atggagg

<:210>: 5
 <:211>: 24
 <:212>: DNA
 <:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 5
 ggcttgttgt gcccaaagcg actc

<:210>: 6
 <:211>: 65
 <:212>: DNA
 <:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 6
 agcttagatc tgcaagacc ttctctata taaggaagtt catttcattt ggagaggaca
 10 20 30 40 50 60
 cgctg
 65

<:210>: 7
 <:211>:
 <:212>: DNA
 <:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 7
 gatccagcgt gtcctctcca aatgaaatga acttccttat atagaggaag ggtcttgcag
 10 20 30 40 50 60
 atcta
 65

【図面の簡単な説明】

【図 1】 プラスミド pBI221 から pGAL4DB-AtERF4 を構築する手順を示す図である。

【図 2】 レポーター遺伝子 GAL4-LUC を構築する手順の前半部を示す図である。

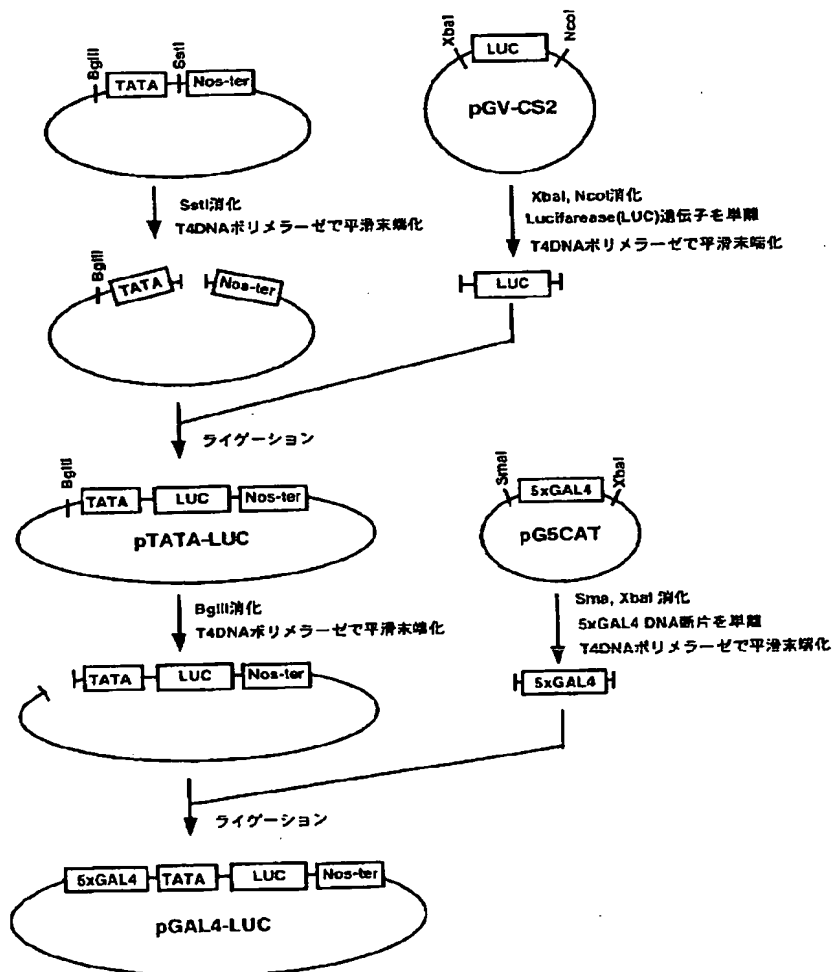
【図 3】 図 2 に引き続きレポーター遺伝子 GAL4-LUC を

構築する手順の後半部を示す図である。

【図4】Aはリポーター遺伝子とエフェクタープラスミドを示す図である。図において、5xGAL4: GAL4転写因子DNA結合配列、TATA: CaMV35SプロモーターTATAボックスを含む領域、LUC: ルシフェラーゼ遺伝子、CaMV 35S: カリフラワーモザイクウイルス35Sタンパク質遺伝子プロモーター、GAL4 DB: 酵母GAL4転写因子DNA結合ドメインコード領域、Nos: ノバリン合成酵素遺伝子転写終止領域を表す。BはAtERF4およびAtERF4のディリーションがリポーター遺伝子の活性(Relative Activity)に及ぼす

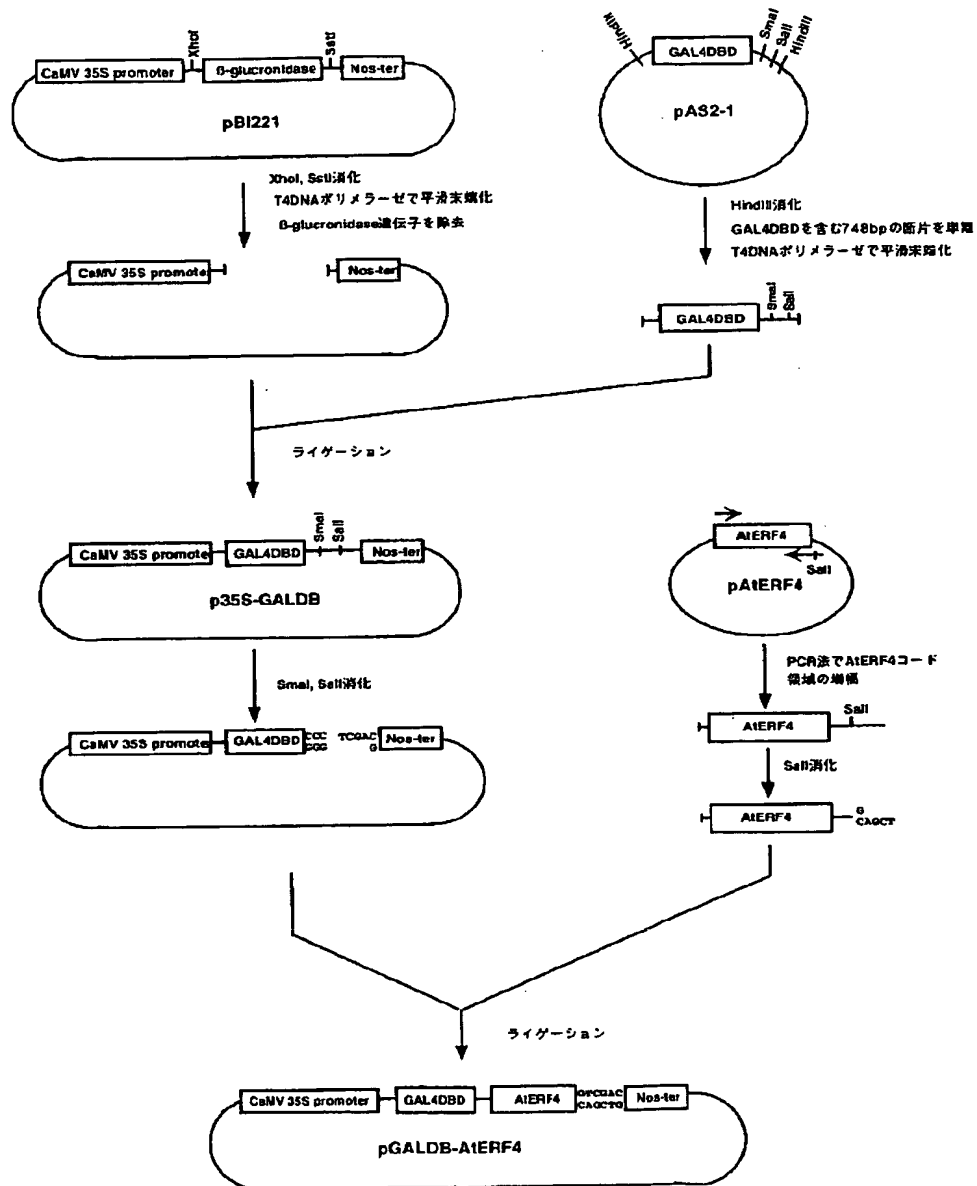
影響を示す図である。図において、左の数字(183/22)は、AtERF4のアミノ酸領域を示す。真ん中のボックスは左の数字に該当するアミノ酸配列領域を示す。右のグラフは、左の領域をもつエフェクタープラスミドを導入したときのリポーター遺伝子の活性を示す。エフェクターを入れないときのリポーター遺伝子の活性を100とした。AtERF4およびAtERF4ディリーションのエフェクターでアミノ酸配列183/222を持つエフェクターがリポーター遺伝子の活性を50%に減少させ、転写を抑制する効果を持つことが示されている。

【図2】

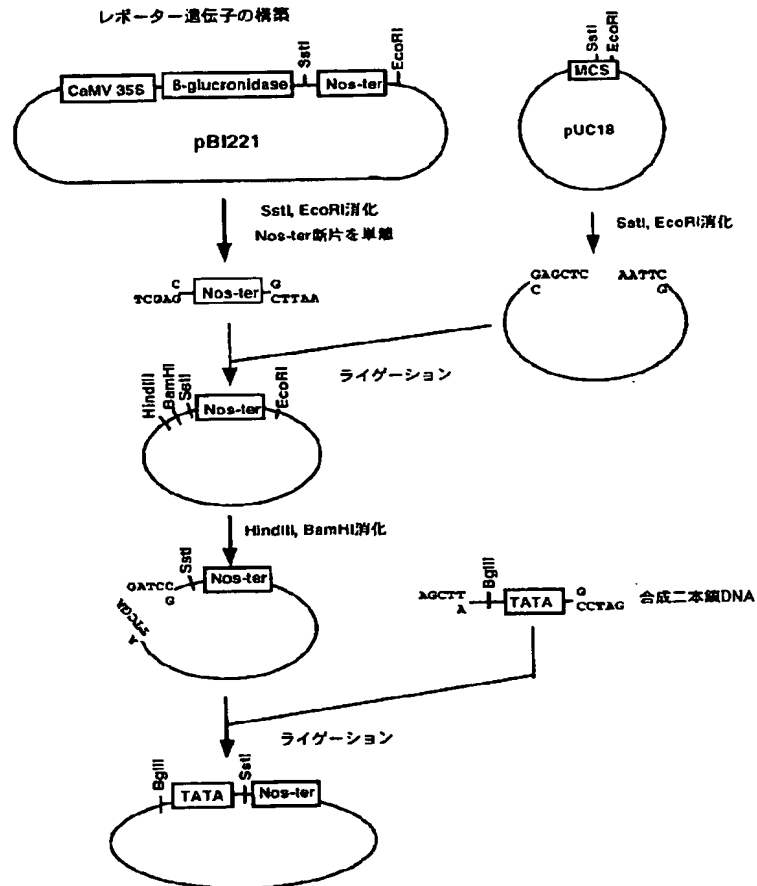


【図1】

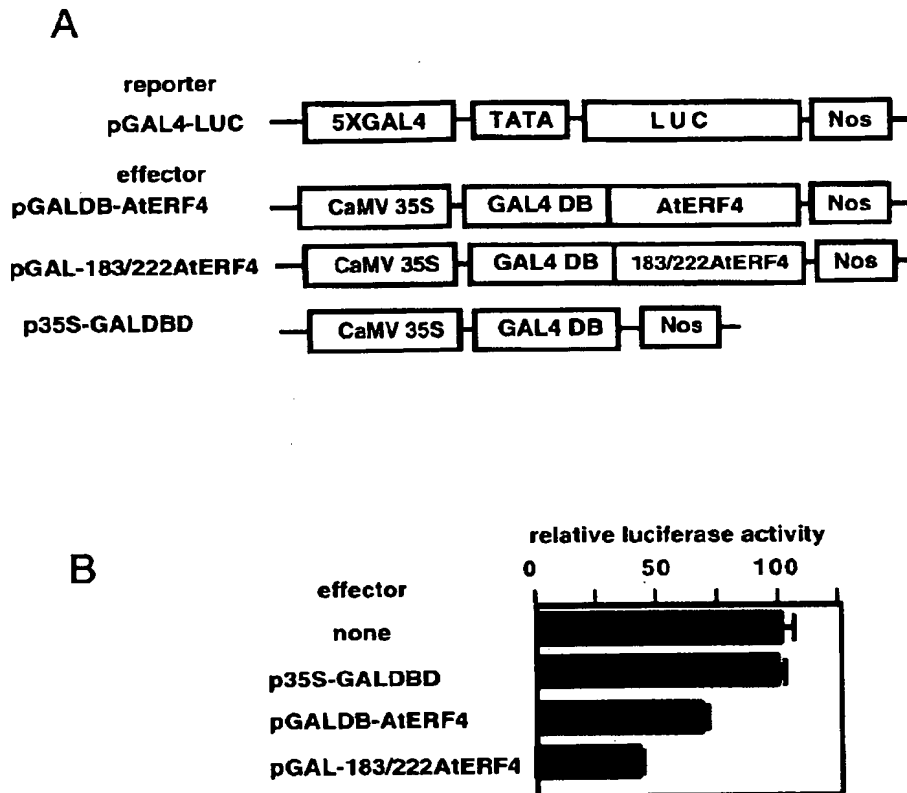
エフェクタープラスミドの構築



【図3】



【図4】



【手続補正書】

【提出日】平成12年4月11日（2000. 4. 11）

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正内容】

【0014】（レポーター遺伝子の構築：図2及び図

3）プラスミドpUC18を制限酵素EcoRIとSstIで消化する。pBI221（クローンテック社）を制限酵素EcoRIとSstIで消化し、Nos-ter（nopaline synthase terminator）を領域含む270bpのDNA断片を挿入するアガロースゲル電気泳動によって単離する。得られた断片を制限酵素EcoRIとSstIで消化しておいたプラスミドpUC18のEcoRI-SstI部位に挿入する。カリフラワーモザイクウイルス35SプロモーターTATAボックスを含む相補鎖のDNA 1

（配列番号6）AGCTTAGATCTGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTG及びDNA 2（配列番号7）GATCCAGCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCTTATATAGAGAAAGGGTCTTGAGATCTAを合成する。合成したDNAを90℃2

分加熱した後、60℃で1時間加熱し、その後室温（25℃）で2時間静置してアニーリングさせ2本鎖を形成させる。Nos-terを持つpUC18プラスミドを制限酵素HindIIIとBamHIで消化する。合成した2本鎖DNAをpUC18のHindIII-BamHI部位に挿入し、TATA-boxとNos-terを含むプラスミドを構築する。上記の手順は、図2に示した。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正内容】

【0018】（エレクトロポレーションによる遺伝子導入）上記で得たプロトプラストを濃度が 2.5×10^6 細胞/mLになるようにエレクトロポレーション緩衝液（5 mM MES pH5.8, 70 mM KCl, 0.3 M マニトール）に再懸濁する。エレクトロポレーション用キュベット（ジーンパルサーキュベット 0.4 cm electrode, バイオラッド社製）に構築したpGAL4-LUCレポーター遺伝子とエフェクタープラスミドとしてpGALDB-AtERF4あるいは

そのデレションシリーズ (pGALDB-1/25AtERF4~pGALDB-204-225AtERF4) のDNAを 各10ugと リファレンス遺伝子プラスミド1ugを 100 μ L の 2X エレクトロポレーション緩衝液 (10 mM MES pH5.8, 140 mM KCl, 0.6 M マニトール) を加えて、滅菌水で全量を 200 μ L にする。キューベットの 600 μ L のプロトプラスト懸濁液を入れて、エレクトロポレーター (Genepulser II Electropor

ation System/バイオラッド社製) を用いて 600 V, 25 μ F の条件で DNA を導入する。導入後、キューベットからプロトプラストを1,000 rpm で5分間遠心して回収し、5 mL の 0.4 M マニトールを含む MS 培地 にプロトプラストを再懸濁して、26°Cで6時間暗所で静置した後、レポーター遺伝子の活性を測定した。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テ-マコード (参考)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/00

Z N A A

// C 1 2 P 21/02

5/00

C

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA05 AA08 AA20 BA80
CA04 DA01 EA04 FA02 GA14
GA17 GA21 HA01 HA17
4B064 AG01 BA12 BA14 CA11 CA19
CC24 DA01 DA10 DA11
4B065 AA88X AA88Y AA89X AB01
AC14 BA03 BA10 CA24 CA41
CA44 CA53
4H045 AA10 BA10 BA20 CA30 EA01
EA05 EA28 FA72 FA74 HA04
HA05

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.